

R2

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-108889

(43)Date of publication of application : 23.04.1999

(51)Int.Cl.

G01N 27/447
G01N 21/64

(21)Application number : 09-265333

(71)Applicant : HITACHI LTD
HITACHI INSTR ENG CO LTD

(22)Date of filing : 30.09.1997

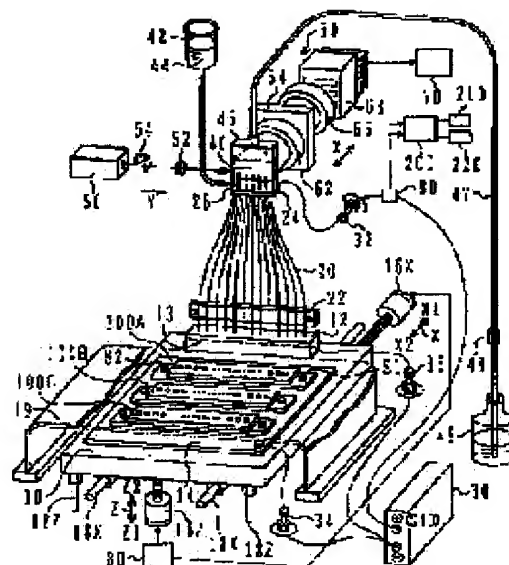
(72)Inventor : IMAI KAZUNARI
WATANABE SUSUMU

(54) CAPILLARY ELECTROPHORETIC APPARATUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a capillary electrophoretic apparatus capable of ensuring the reliability of data even in a case repeatedly used in analysis a plurality of times without replacing a gel.

SOLUTION: A sample introduced into a plurality of capillaries 20 packed with an electrophoretic medium is separated electrophoretically and a plurality of sample components are optically detected by detecting laser excited multi-wavelength fluorescence by a detector unit 60. A capillary judging means 200 calculates the half-width of the predetermined single peak [e.g.; the single peak of guanine (G) of 345G] in the signal peaks corresponding to the respective components in the sample detected by the detector unit and, when this calculated half-width is narrower than a predetermined reference level, the state of the capillaries 20 is judged to be good.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.01.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3481831

[Date of registration] 10.10.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-108889

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月23日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 27/447
21/64G 0 1 N 27/26
21/643 1 5 K
Z

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平9-265333

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月30日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(71) 出願人 000233240

日立計測エンジニアリング株式会社

312 茨城県ひたちなか市堀口字長久保832番地2

(72) 発明者 今井 一成

茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会社日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 渡辺 進

茨城県ひたちなか市堀口字長久保832番地2 日立計測エンジニアリング株式会社内

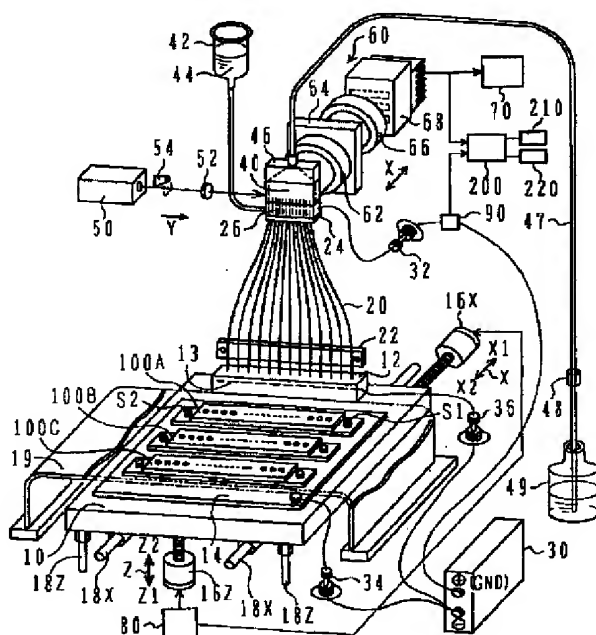
(74) 代理人 弁理士 春日 謙

(54) 【発明の名称】 キャピラリー電気泳動装置

(57) 【要約】

【課題】 本発明の目的は、ゲルを交換することなく複数回の分析に繰り返し使用する場合でも、データの信頼性を確保することができるキャピラリー電気泳動装置を提供することにある。

【解決手段】 電気泳動媒体が充填された複数のキャピラリー20に導入された試料は、電気泳動分離され、複数の試料成分が検知器ユニット60によってレーザ励起多波長蛍光検出により光学的に検知される。キャピラリー判定手段200は、検知器ユニットによって検出された試料中の各成分に対応する信号ピークの中の所定のシングルピーク（例えば、345Gのグアニン（G）のシングルピーク）の半値幅を求め、この求められた半値幅が所定の基準レベルよりも狭いときに、キャピラリー20の状態が良好であると判定する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】電気泳動媒体が充填された複数のキャピラリーと、
これらのキャピラリーに導入され、電気泳動分離された複数の試料成分を光学的に検知する検知器とを有し、
上記キャピラリーの両端に電圧を印加し、キャピラリーの一方の端に導入した試料を他の端に向けて移動させながら、分離展開し、試料中の各成分を分離分析するキャピラリー電気泳動装置において、
上記キャピラリーの状態の良否を判定するキャピラリー判定手段を備えたことを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 2】請求項 1 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記キャピラリー判定手段は、上記検知器によって検出された試料中の各成分に対応する信号ピークの中の所定のシングルピークの半値幅を求め、この求められた半値幅が所定の基準レベルよりも狭いときに、上記キャピラリーの状態が良好であると判定することを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 3】請求項 2 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記検知器は、レーザ励起多波長蛍光検出により電気泳動分離された複数の試料成分を光学的に検知するとともに、
上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、検出される複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが短波長側に極大ピークを有するものとすることを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 4】請求項 3 記載のキャピラリー電気泳動装置において、さらに、
上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークの両側に表れるピークが、検出される複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが長波長側に極大ピークを有するものとすることを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 5】請求項 2 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記検知器は、レーザ励起多波長蛍光検出により電気泳動分離された複数の試料成分を光学的に検知するとともに、
上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、検出される複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが短波長側から 2 番目に極大ピークを有するとし、このピークの両側に表れるピークが、検出される複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが長波長側に極大ピークを有するものとすることを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 6】請求項 2 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、上記キャピラリーに導入された標準試料の中の所定のピークであることを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 7】請求項 2 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、上記複数のキャピラリーにそれぞれ導入された未知試料の中の所定のピークであり、複数の未知試料の所定のピークを用いてキャピラリーの状態の良否を判定することを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 8】請求項 1 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記キャピラリー判定手段は、上記キャピラリーの両端に泳動電圧を印加としたときに流れる泳動電流を検出し、この泳動電流が、所定の基準レベルの範囲内にあるときに、上記キャピラリーの状態が良好であると判定することを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 9】請求項 8 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記キャピラリー判定手段は、試料をキャピラリーに導入してキャピラリーの両端に電圧を印加した時に検出される本泳動時の泳動電流を用いて、上記キャピラリーの状態の良否を判定することを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【請求項 10】請求項 8 記載のキャピラリー電気泳動装置において、
上記キャピラリー判定手段は、試料をキャピラリーに導入することなくキャピラリーの両端に電圧を印加した時に検出される予備泳動時の泳動電流を用いて、上記キャピラリーの状態の良否を判定することを特徴とするキャピラリー電気泳動装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸、蛋白、糖等を分離分析する電気泳動装置に関し、特に、主として電気泳動媒体に高分子ゲルをキャピラリーに充填したものをを用い、DNA（核酸）等の検出、塩基配列決定等に好適なキャピラリー電気泳動装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から電気泳動を利用した分析は多く利用されているが、その中で重要な分析は DNA の塩基配列決定である。塩基配列決定には、従来は、2 枚のガラスの平板の間に、ポリアクリルアミドゲルを挟んで形成させた電気泳動媒体を用いていた。それに対して、最近、例えば、特開平 6-138037 号公報等に記載されているように、取り扱いを容易にし、短時間で分析を

行うことができるキャピラリーにゲルを充填させた電気泳動媒体を用いる方法が開発されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来の方法では、キャピラリーを電気泳動媒体に用いる場合も含め、充填されたゲルは1測定ごとに消耗され、毎回取り替えるようにしている。ゲルの交換は、内径100 μ m以下のキャピラリー内にゲルをシリンダ等を用いて加圧・圧入する方法を用いるが、多数のキャピラリーのゲルを充填する作業は時間を要するものである。また、毎回キャピラリーを交換する場合には、キャピラリーの交換作業は手作業となるため、複数の試料を自動的に分析することは困難であった。

【0004】交換作業を減らし、自動化を進めるためには、同一のゲルで複数回繰返し使用できるようにすればよいが、単純に繰返し使用するだけでは、性能の劣化が起るため、データの信頼性が確保できないという問題があった。

【0005】本発明の目的は、ゲルを交換することなく複数回の分析に繰返し使用する場合でも、データの信頼性を確保することができるキャピラリー電気泳動装置を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

(1) 上記目的を達成するために、本発明は、電気泳動媒体が充填された複数のキャピラリーと、これらのキャピラリーに導入され、電気泳動分離された複数の試料成分を光学的に検知する検知器とを有し、上記キャピラリーの両端に電圧を印加し、キャピラリーの一方の端に導入した試料を他の端に向けて移動させながら、分離展開し、試料中の各成分を分離分析するキャピラリー電気泳動装置において、上記キャピラリーの状態の良否を判定するキャピラリー判定手段を備えるようにしたものである。かかる構成により、ゲルを交換することなく複数回の分析に繰返し使用する場合でも、データの信頼性を確保し得るものとなる。

【0007】(2) 上記(1)において、好ましくは、上記キャピラリー判定手段は、上記検知器によって検出された試料中の各成分に対応する信号ピークの中の所定のシングルピークの半値幅を求め、この求められた半値幅が所定の基準レベルよりも狭いときに、上記キャピラリーの状態が良好であると判定するようにしたものである。かかる構成により、特定のシングルピークの半値幅を求めることにより、キャピラリーの状態判定を容易に行い得るものとなる。

【0008】(3) 上記(2)において、好ましくは、上記検知器は、レーザ励起多波長蛍光検出により電気泳動分離された複数の試料成分を光学的に検知するとともに、上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、検出される

複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが短波長側に極大ピークを有するものとしたものである。かかる構成により、他の試料成分のピークの影響を低減して、半値幅を求め得るものとなる。

【0009】(4) 上記(3)において、好ましくは、さらに、上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークの両側に表れるピークが、検出される複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが長波長側に極大ピークを有するものとしたものである。かかる構成により、他の試料成分をピークの影響を受けることなく、半値幅を求め得るものとなる。

【0010】(5) 上記(2)において、好ましくは、上記検知器は、レーザ励起多波長蛍光検出により電気泳動分離された複数の試料成分を光学的に検知するとともに、上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、検出される複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが短波長側から2番目に極大ピークを有するとし、このピークの両側に表れるピークが、検出される複数の試料成分のピークの中で、その蛍光スペクトルが長波長側に極大ピークを有するものとしたものである。かかる構成により、短波長側に極大ピークを有するものがない場合でも、所定のピークを用いたキャピラリーの状態の良否の判定を行い得るものとなる。

【0011】(6) 上記(2)において、好ましくは、上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、上記キャピラリーに導入された標準試料の中の所定のピークとしたものである。かかる構成により、既に既知のピークを用いることができるため、容易にキャピラリーの状態の良否の判定を行い得るものとなる。

【0012】(7) 上記(2)において、好ましくは、上記キャピラリー判定手段がキャピラリーの状態の良否判定に用いる所定のシングルピークは、上記複数のキャピラリーにそれぞれ導入された未知試料の中の所定のピークであり、複数の未知試料の所定のピークを用いてキャピラリーの状態の良否を判定するようにしたものである。かかる構成により、標準試料を用いることなくキャピラリーの状態の良否を判定できるため、一度に分析可能な試料数を増加し得るものとなる。

【0013】(8) 上記(1)において、好ましくは、上記キャピラリー判定手段は、上記キャピラリーの両端に泳動電圧を印加としたときに流れる泳動電流を検出し、この泳動電流が、所定の基準レベルの範囲内にあるときに、上記キャピラリーの状態が良好であると判定するようにしたものである。かかる構成により、泳動電流を検出するという簡便な方法で、キャピラリーの状態の良否を判定し得るものとなる。

【0014】(9) 上記(8)において、好ましくは、

上記キャピラリー判定手段は、試料をキャピラリーに導入してキャピラリーの両端に電圧を印加した時に検出される本泳動時の泳動電流を用いて、上記キャピラリーの状態の良否を判定するようにしたものである。

【0015】(10)上記(8)において、好ましくは、上記キャピラリー判定手段は、試料をキャピラリーに導入することなくキャピラリーの両端に電圧を印加した時に検出される予備泳動時の泳動電流を用いて、上記キャピラリーの状態の良否を判定するようにしたものである。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、図1～図11を用いて、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置の構成及び動作について説明する。最初に、図1を用いて、本実施形態によるキャピラリー電気泳動装置の全体構成について説明する。図1は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置の全体構成を示すブロック図である。

【0017】最初に全体の構成について説明する。移動機構10の上には、バッファ（電解液）を収容した泳動バッファ槽12が配置されている。泳動バッファ槽12の中には、白金電極13が張架されており、白金電極13は、バッファと接触している。また、移動機構10の上には、サンプルトレイホルダ14を介して、3個のサンプルトレイ100A、100B、100Cが配置されている。サンプルトレイ100Aは、図2を用いて後述するように、48個の試料容器を備えている。サンプルトレイ100Aは、止めネジS1、S2によってサンプルトレイホルダ14に固定されており、サンプルトレイホルダ14から取り外し可能である。サンプルトレイ100Aの底部は、SUSのような導電性金属で構成されており、SUSのような導電性金属で構成されてサンプルトレイホルダ14と電氣的に導通している。サンプルトレイ100B、100Cも同様に、48個の試料容器を備えており、サンプルトレイ100B、100Cの底部は、サンプルトレイホルダ14と電氣的に導通している。

【0018】移動機構10は、上下移動用モータ16Zを用いて、上下スライドガイド18Zに沿って、Z軸方向に上下移動可能である。また、移動機構10は、前後移動用モータ16Xを用いて、前後スライドガイド18Xに沿って、X軸方向に前後移動可能である。上下移動用モータ16Z及び前後移動用モータ16Xは、制御装置80によって制御される。また、3個のサンプルトレイ100A、100B、100Cを覆うようにして、塩化ビニルやアクリル樹脂等の透明なカバー19が配置されており、試料容器に保持された試料の蒸発の抑制や外部からのゴミの混入を防止している。

【0019】48本のキャピラリー20が並列的に配置されており、その内部には、分離用の架橋ポリアクリル

アミドゲルが電気泳動媒体として充填されている。キャピラリー20の下端側はキャピラリー押さえ22により固定され、その下端は泳動バッファ槽12内のバッファに挿入されている。キャピラリー20の上端側は、キャピラリー押さえ24により固定され、その上端は、カプラ26に接続固定されている。

【0020】キャピラリー20の長さは、30cmとしている。キャピラリー20に充填された架橋ポリアクリルアミドゲルは、全アクリルアミドおよびビスーアクリルアミドから成っている。全アクリルアミドは、全ゲルに対して5重量%、全アクリルアミドに対するビスーアクリルアミドの重量は10%である。

【0021】カプラ26は、接地側の電極プラグ32に接続され、電極プラグ32は、高電圧電源30の接地極に接続されている。また、サンプルトレイホルダ14は、高圧側の電極プラグ34と接続され、バッファ槽12の白金電極13は、高圧側の電極プラグ36と接続され、電極プラグ34、36は、高電圧電源30の高圧（一）極に接続されている。

【0022】カプラ26は、シースフローセル40に接続されている。シースフローセル40には、シース液タンク42の中に保持されたシース液44が、重力によって導入される。キャピラリー20の中で泳動分離され、キャピラリー20の泳動終端部から流出する分離された試料は、シース液によって各キャピラリーの試料成分が互いに分離されたまま上部側に運ばれる。

【0023】シースフローセル40の側面方向（図示Y方向）からは、レーザ50から射出したレーザ光が、レンズ42によって平行光束にコリメートされた上で、照射され、シースフローセル40中の分離された試料を励起する。レーザ50とレンズ52の間には、シャッター54が設けられており、試料の励起を選択的に行えるようになっている。

【0024】レーザ光照射によって発生した蛍光は、Y軸方向に直交するX軸方向から取り出され、検知器ユニット60によって検知される。検知器ユニット60は、図2を用いて後述するように、集光レンズ62と、フィルタ64と、結像レンズ66と、光センサ68によって構成されている。レーザ光照射によって発生した蛍光は、集光レンズ62によって集光され、フィルタ64によって検出すべき波長の光が選択され、さらに、結像レンズ66によって、2次元CCDセンサ等の光センサ68上に結像する。光センサ68によって検出された信号は、信号処理装置70に送られ、信号処理され、蛍光の波長により末端塩基の種類を識別し、計測信号をもとに核酸試料の塩基配列が解析される。

【0025】DNA（デオキシリボ核酸）の塩基配列の決定では、一般的に4波長の計測が行われる。各極大波長が、それぞれ、DNA断片の末端の塩基の種類に対応するように、予め反応操作で蛍光色素が結合される。

【0026】また、光センサ68によって検出された信号は、キャピラリー判定装置200に入力する。キャピラリー判定装置200は、光センサ68によって検出された信号の中の特定のピークの半値幅を求め、求められた半値幅が基準となるレベルよりも狭い場合には、キャピラリー20の状態が良好であると判定し、また、基準となるレベルよりも広い場合には、キャピラリー20の状態が不良であると判定する。キャピラリー判定装置200における判定方法の詳細については、図4以降を用いて後述する。キャピラリー判定装置200による判定結果は、表示部210に表示される。オペレータは、表示部210に表示されたキャピラリー20の判定結果に基づいて、分析の継続やキャピラリーの交換等を判断し、この判断に基づく指示を入力手段220からキャピラリー判定装置200に入力する。

【0027】また、後述するように、キャピラリー判定装置200は、高電圧電源30と電極プラグ32の間に接続された電流検出回路90によって検出された電流値に基づいてもキャピラリー20の状態の良否判定を行うことができる。検出された電流値が、基準となるレベルよりも高い場合には、キャピラリー20の状態が良好であると判定し、また、基準となるレベルよりも低い場合には、キャピラリー20の状態が不良であると判定する。この電流値に基づく良否判定の方法についても、後述する。

【0028】シースフローセル40の上端部には、ドレインアダプタ46が取り付けられており、キャピラリー20からシースフローセル40内に流入した試料を、廃液として、ドレインチューブ47を通して、ドレイン瓶49に排出する。ドレインチューブ47の途中には、オリフィスや複数本のキャピラリーから構成されるフローコントローラが設けられており、ドレインチューブ47の流路抵抗を一定として、流量を制御している。

【0029】次に、本実施形態による電気泳動分析装置の全体的な動作について説明する。最初に、測定前の予備泳動を行う。予備泳動においては、標準試料及び分析試料はキャピラリー20の中には導入されない。キャピラリー20の下端をバッファ槽12内に挿入し、高電圧電源30からキャピラリー20の両端に電圧を印加して、キャピラリー20を平衡化させる。予備泳動においては、電源30から印加する電圧は120V/cmとする。キャピラリー20の長さが30cmの場合、電源30からキャピラリー20の両端には、3600Vを印加する。予備泳動の時間は、20分である。

【0030】一方、サンプルトレイ100A、100B、100Cのそれぞれ48個の試料容器の内、1個の試料容器には、予め標準試料が所定量分注されている。ここで、標準試料としては、例えば、M13mp18を用いている。これ以外にも、例えば、pUC18や、pGEMを標準試料として用いることができる。また、残

りの47個の試料容器には、所定量の分析試料が分注されている。試料の収容されたサンプルトレイ100A、100B、100Cは、サンプルトレイホルダ14に止めネジS1、S2により固定される。制御装置80は、上下移動モータ16Zを駆動して、移動機構10をZ1方向に下降する。キャピラリー20の下端が、バッファ槽12から十分に離れた位置で移動機構10の下降を停止する。次に、制御装置80は、前後移動モータ16Xを駆動して、移動機構10をX1方向に移動する。サンプルトレイ100Aが、キャピラリー20の真下になると、移動機構10の移動を停止する。さらに、制御装置80は、上下移動モータ16Zを駆動して、移動機構10をZ2方向に上昇する。そして、キャピラリー20の先端がサンプルトレイ100Aの中の試料容器中の試料に挿入される位置で、移動機構10の上昇を停止する。移動機構10の上下移動動作及び前後移動動作における位置決めは、移動機構10に設けられたスイッチ等の位置検出機構を用いてなされる。

【0031】キャピラリー20の下端が試料中に挿入されている状態で、サンプルトレイ100Aとカプラ26の間に高電圧電源30から高電圧を印加することにより、試料容器中の試料は、キャピラリー20内に導入される。試料の導入時には、電源30から印加する電圧は、50V/cmで10秒間とする。これによって、試料容器100Aに収容された標準試料及び分析試料がキャピラリー20内に導入される。

【0032】次に、制御装置80は、上下移動モータ16Zを駆動して、移動機構10をZ1方向に下降する。キャピラリー20の下端が、サンプルトレイ100Aから十分に離れた位置で移動機構10の下降を停止する。次に、制御装置80は、前後移動モータ16Xを駆動して、移動機構10をX2方向に移動する。バッファ槽12が、キャピラリー20の真下になると、移動機構10の移動を停止する。さらに、制御装置80は、上下移動モータ16Zを駆動して、移動機構10をZ2方向に上昇する。そして、キャピラリー20の先端がバッファ槽12の中のバッファに挿入される位置で、移動機構10の上昇を停止する。移動機構10の上下移動動作及び前後移動動作における位置決めは、移動機構10に設けられたスイッチ等の位置検出機構を用いてなされる。

【0033】キャピラリー20の下端がバッファ中に挿入されている状態で、白金電極13とカプラ26の間に高電圧電源30から高電圧を印加することにより、キャピラリー20に導入されている試料は、電気泳動により分離される。電気泳動電圧は、120V/cmとする。検知器ユニット60は、分離された各DNA断片成分を検出する。検出には、レーザ励起蛍光検出が用いられる。信号処理ユニット70は、検知器ユニット60によって検出された蛍光の波長により末端塩基の種類を識別し、DNA断片成分に基づいて、試料DNAの塩基配列

を決定する。

【0034】また、試料の電気泳動分析時には、キャピラリー20の状態の監視も行われる。キャピラリー判定装置200は、検出器ユニット60によって検出された各DNA断片成分の中の特定ピークの半値幅を計算して、この計算された半値幅に基づいて、キャピラリー20の状態の良否を判定する。

【0035】サンプルトレイ100Aの中の試料の分析が終了すると、上述したのと同様の手順で、サンプルトレイ100B、100C内の試料がキャピラリー20に

導入され、電気泳動分離される。

【0036】一つの試料の分析には、約2時間程度を要するため、図1に示すように、サンプルトレイホルダ14上に、3個のサンプルトレイ100A、100B、100Cを設置することにより、約6時間の自動分析が可能となる。サンプルトレイの数は3個に限らず、さらにも多くてもよいものである。

【0037】また、電気泳動分離された試料の光学的な検出方法としては、蛍光検出に限らず、吸光度検出などを用いることもできる。

【0038】次に、図2及び図3を用いて、本実施形態による検知器ユニット60の詳細な構成及び受光面における像について説明する。最初に、図2を用いて、本実施形態による検知器ユニット60の詳細な構成について説明する。図2は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動分析装置に用いる検知器ユニットの構成を示す光学系のブロック図である。

【0039】DNA（デオキシリが核酸）の塩基配列決定では、一般的に4波長の計測が行われる。各極大波長が、それぞれDNA断片の末端の塩基の種類に対応するよう予め反応操作で、蛍光色素が結合される。

【0040】発光点EPから発する蛍光は、レンズ62で集光される。発光点EPは、図1に示したキャピラリー20によって分離された試料に、レーザ50からの光を照射することにより発せられた蛍光である。レンズ62は、図示の例では、1枚のレンズとして示しているが、複数枚のレンズによって構成することができる。レンズ62の焦点位置に発光点EPが位置するように、発光点EPとレンズ62とを配置することにより、レンズ62によって集光された光は、平行光束となり、検知器

ユニット60に導かれる。

【0041】ここで、図1との相関をとる意味で、キャピラリー20の延在する方向をZ軸方向とし、レンズ62によって平行光束となった光軸をX軸とする。また、図1に示したように、複数本のキャピラリー20は、紙面に垂直なY軸方向に平行に配置されているものとする。

【0042】検知器ユニット60は、集光レンズ62と、フィルター64と、直角プリズム65A～65Dと、結像レンズ66A、66Bと、空間フィルタ（スリ

ット）67A、67Bと、4個の1次元光センサ68A～68Dによって構成されている。

【0043】フィルター64は、バンドパスフィルターであり、4種類の波長の光を選択するフィルター64A、64B、64C、64Dから構成されている。フィルター64Aは、第1の波長λ1の光を選択するものであり、波長λ1は、例えば、520nmであり、核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるグアニン（G）の蛍光ピーク波長である。フィルター64Bは、第3の波長λ3の光を選択するものであり、波長λ3は、例えば、580nmであり、核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるチミン（T）の蛍光ピーク波長である。フィルター64Cは、第2の波長λ2の光を選択するものであり、波長λ2は、例えば、540nmであり、核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるアデニン（A）の蛍光ピーク波長である。フィルター64Dは、第4の波長λ4の光を選択するものであり、波長λ4は、例えば、605nmであり、核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるシトシン（C）の蛍光ピーク波長である。フィルター64A、64B、64C、64Dのバンドパスは、20nmである。

【0044】フィルター64を通過した光束は、4個の直角プリズム65A、65B、65C、65Dによって、直角に曲げられるとともに、4本の光束に分割される。即ち、本実施形態における光学系においては、1本の光束を4本の光束に分割するようにしている。

【0045】4本の光束は、レンズ66A、66Bによって収束し、1次元光センサ68A、68B、68C、68Dの受光面に結像する。即ち、1個の発光点EPから発せられた光は、4種類の波長の光をフィルター64A～64Dによって選択された後、4個の1次元光センサ68A～68Dによって、それぞれ4種類の波長に対する蛍光の光強度が検知される。ここで、キャピラリー20が例えば、48本平行に配置されている場合、1次元光センサ68は、48個の受光面を有している。48個の受光面は、Y軸方向（紙面に垂直な方向）に配置されている。従って、48本のキャピラリー20の中の48個の発光点から発せられた光は、4種類の波長の光をフィルター64A～64Dによって選択された後、4個の1次元光センサ68A～68Dの上の48個の受光面によって、それぞれ4種類の波長に対する蛍光の光強度が検知される。

【0046】また、レンズ66A、66Bと、1次元光センサ68A、68B、68C、68Dとの間には、空間フィルター（スリット）67A、67Bが配置されており、迷光を防止している。

【0047】次に、図3を用いて、本実施形態における発光点と1次元光センサの受光面に形成された像の関係について説明する。図3は、本発明の一実施形態による多色蛍光検出電気泳動分析装置における発光点と1次元

光センサの受光面に形成された像の関係の説明図である。

【0048】図3(A)は、発光点の様子を示している。ここでは、説明の都合上、キャピラリー20の本数は5本の場合について例示しており、キャピラリー20の中では、分離された試料に、レーザからの光を照射することにより、蛍光が発生しており、発光点EPを形成している。

【0049】図3(B)は、1次元光センサ68A~68Dの受光面に形成された発光点EPの像を示している。1次元光センサ68A~68Dの受光面に形成された像は、それぞれ、異なる波長の光に対する像である。

【0050】本実施形態では、必要な情報だけが、1次元光センサ68A~68Dの受光面に結像され、それをそのまま活用できるため、処理が単純化できる。

【0051】以上説明したように、本実施形態においては、4個の直角プリズム65A~65Dを用いて、光束を分割している。1次元光センサ68Aと1次元光センサ68Bの間の距離L1は、大きい方がよく、1次元光センサを基板上に配置した検知器の大きさが、50mmあるとすれば、距離L1は、50mm程度必要である。ここで、本実施形態においては、平行光束中に配置した直角プリズムを用いて、光束を分割しているため、直角プリズム65Aと直角プリズム65Bの距離L2は、自由に定めることができるため、距離L2を50mm程度に広げることが容易に行える。

【0052】また、本実施形態においては、1個の検知器ユニット60によって4種類の波長の光を同時に測定するようにしているため、レンズ62と発光点EPの間の距離L3は、レンズ62の焦点距離を短くすることによって、容易に短くすることができるため、発光点EPの光を検知器ユニット60に取り込む立体角を大きくすることができるため、検出感度を向上することができる。

【0053】また、光束を分割する手段として、直角プリズム65を使用しており、直角プリズム65の1辺を光学ベースに平行に設置することにより、容易に光軸を一致させることができるため、製作が容易となる。

【0054】なお、フィルター64A~64Dの配置する位置としては、レンズ62と直角プリズム65との間の代わりに、平行光束中である直角プリズム65とレンズ66との間に配置してもよいものである。また、レンズ66と空間フィルタ67の間は、収束光束であるが、この位置にフィルタ64を配置するようにしてもよいものである。

【0055】また、レンズ62は、発光点EPから発せられた光を平行光束としているが、ほぼ平行光束である多少収束するような光束としてもよいものである。

【0056】また、直角プリズム65の代わりに、平面ミラーを用いてもよいものである。

【0057】さらに、空間フィルタ(スリット)は、必要に応じて、レンズ66の前後または直角プリズム65の前後に挿入される。

【0058】次に、図4~図11を用いて、本実施形態によるキャピラリー判定装置200におけるキャピラリーの状態の判定方法について説明する。最初に、図4を用いて、電気泳動分離分析によって得られるクロマトグラムについて説明する。

【0059】図4は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置によって得られるクロマトグラムの模式図である。

【0060】図4において、横軸は、塩基長(base)を示しており、縦軸は検出された蛍光の信号強度を示している。なお、検出器ユニット60の光センサ68から得られる信号は、横軸を時間(time)とし、縦軸を信号強度とするものであるが、この横軸を時間(time)から塩基長(base)に換算して図示している。

【0061】図4において、同図(A)は、用いたキャピラリーの状態が良好な場合のクロマトグラムを示している。即ち、塩基長bnに現れるシングルピークは、半値幅wの狭いシャープなピークを示している。また、塩基長biと塩基長bi+1に現れるピークは、互いにその底辺付近で重なりあうマルチピークとなっているが、それでも、2つのピークはその頂部において分離しており、2つのピークから構成されることは明確である。

【0062】一方、図4(B)は、用いたキャピラリーの状態が不良な場合のクロマトグラムを示している。即ち、塩基長bnに現れるシングルピークは、半値幅wが広がっている。また、塩基長biと塩基長bi+1に現れるピークは、互いに重なりあうマルチピークであるが、2つのピークからなるものか、それとも、シングルピークであるかの判別が定かでなくなっている。

【0063】そこで、本実施形態においては、シングルピークの半値幅wに基づいて、検出された半値幅wが、基準となる半値幅w0よりも狭い場合には、キャピラリーが良好であると判定し、半値幅wが、基準となる半値幅w0よりも広い場合には、キャピラリーが不良であると判定するようにしている。

【0064】次に、図5を用いて、末端塩基をレーザ光励起した場合に検出される蛍光スペクトルについて説明する。図5は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置を用いて、各末端塩基から得られる蛍光スペクトルである。なお、図5において、横軸は波長(nm)であり、縦軸は蛍光強度(任意単位)を示している。

【0065】核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるグアニン(G)の蛍光ピーク波長は、527nmである。核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるアデニン(A)の蛍光ピーク波長は、555nmである。ま

た、核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるチミン (T) の蛍光ピーク波長は、577nmである。さらに、核酸構成成分であるプリン塩基の一つであるシトシン (C) の蛍光ピーク波長は、602nmである。

【0066】例えば、グアニン (G) の蛍光スペクトルは、ピークの極大波長を中心として、短波長側と長波長側を比較すると、短波長側では、比較的シャープに信号強度が変化し、長波長側で緩やかに信号強度が変化するという特性を示す。これは、他のアデニン (A)、チミン

(T)、シトシン (C) についても同様である。一方、検知器ユニット60に用いるバンドパスフィルタ64のバンドパスは、20nmであり、4種類のバンドパスフィルタ64A、64B、64C、64Dの中心波長は、520nm、550nm、580nm、605nmである。図5において、図中斜線で示した領域が、バンドパスフィルタ64A、64B、64C、64Dの光透過領域である。グアニン (G)、アデニン (A)、チミン (T)、シトシン (C) については、それぞれの蛍光スペクトルの極大ピーク波長とバンドパスフィルタの中心波長をほぼ一致させている。

【0067】従って、キャピラリーの良否判定のために用いる特定ピークとして、シトシン (C) を用いると、中心波長が605nmでバンドパスが20nmのバンドパスフィルタを用いた場合、図示するように、波長595nm～615nmの波長の蛍光の中には、グアニン (G) や、アデニン (A) や、チミン (T) の蛍光成分が混じることになり、正確にシトシン (C) だけの半値幅を測定することは困難である。

【0068】一方、キャピラリーの良否判定のために用いる特定ピークとして、グアニン (G) を用いると、中心波長が520nmでバンドパスが20nmのバンドパスフィルタを用いた場合、図示するように、波長510nm～530nmの波長の蛍光の中には、アデニン

(A) や他の塩基の蛍光の影響は殆どないため、グアニン (G) を用いることにより、正確にグアニン (G) だけの半値幅を測定することが可能である。従って、グアニン (G) のシングルピークを用いることが、キャピラリーの状態の良否判定をするためには、もっとも好ましいものである。

【0069】しかしながら、グアニン (G) のシングルピークが適当な塩基長にない場合もある。そのような場合には、アデニン (A) のシングルピークを用いることができる。但し、アデニン (A) の蛍光スペクトルは、グアニン (G) の蛍光スペクトルが重畳するため、判定に用いるアデニン (A) の塩基長の短塩基長側と長塩基長側に、グアニン (G) のピークがないことが条件となる。また、チミン (T) の蛍光スペクトルもアデニン

(A) と重畳するため、判定に用いるアデニン (A) の塩基長の短塩基長側と長塩基長側に、チミン (T) のピークがないことが条件となる。換言すると、判定に用い

るアデニン (A) のシングルピークの両側の塩基長に、シトシン (C) のピークがある場合には、それらの蛍光の影響は受けないため、このアデニン (A) のシングルピークをキャピラリーの状態の良否判定に用いることができる。

【0070】以上整理すると、キャピラリーの状態の良否判定に用いる特定ピークは、シングルピークであることが必要である。そして、その特定ピークは、検出される複数の塩基のピークの中で、その蛍光スペクトルが短波長側に極大ピークを有するものとする必要がある。最も短波長側の特定ピークがない場合には、蛍光スペクトルが次に短波長側に極大ピークを有するものとする。但し、この場合には、この特定ピークの両側の塩基長に、蛍光スペクトルの極大ピークが短波長側及び長波長側の隣接する塩基のピークが無い必要がある。

【0071】次に、図6及び図7を用いて、実際に得られるクロマトグラムを用いて、キャピラリーの状態の良否判定に用いる特定ピークの選定の具体例について説明する。図6及び図7は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置において測定される標準試料の電気泳動分離分析によって得られたクロマトグラムである。

【0072】ここで、本実施形態においては、解析塩基長は、0塩基長 (base) から300塩基長 (base) とする。このような解析塩基長においては、キャピラリーの状態の良否判定に用いる特定ピークは、解析塩基長の範囲の中で、最大塩基長側、即ち、上述の例では、300塩基長付近のシングルピークを用いる。

【0073】そして、図6は、標準試料としてM13mp18を用いた場合の、236塩基長から300塩基長付近のクロマトグラムを示しており、図7は、301塩基長から365塩基長付近のクロマトグラムを示している。即ち、300塩基長を中心として、±65塩基長の範囲を示している。図6及び図7において、横軸は塩基長 (base) であり、縦軸は蛍光強度 (任意単位) を示している。また、図6及び図7において、Gはグアニンを示しており、Aはアデニンを示しており、Tはチミンを示しており、Cはシトシンを示している。

【0074】最初に、図6において、300塩基長 (base) 付近で、グアニン (G) のシングルピークを捜すと、288G若しくは345Gがグアニン (G) のシングルピークである。また、300塩基長 (base) から少し離れるが、258G若しくは260Gもグアニン (G) のシングルピークである。しかも、288G、345G、258G若しくは260Gの短塩基長側および長塩基長側にある塩基は、シトシン (C) である。図5において説明したように、シトシン (C) の蛍光スペクトルは、グアニン (G) の蛍光スペクトルとは波長領域が異なるため、両側にシトシン (C) があるグアニン (G) のシングルピークが最も好ましいものである。

【0075】288G, 345Gのグアニン(G)のシングルピークについて比較すると、288Gは、短塩基長側に1つのシトシン(C)が存在し、長塩基長側に2つのシトシン(C)が存在するのに対して、345Gは、短塩基長側にも、長塩基長側にも2つのシトシン(C)が存在する。従って、他の塩基の影響を受けにくいという観点からは、345Gのグアニン(G)のシングルピークの方が、288Gのグアニン(G)のシングルピークよりも、キャピラリーの状態の良否を判定に用いるには好ましいものである。

【0076】また、277G, 279G, 303G, 305G, 307G等のグアニン(G)のシングルピークは、その両側に、チミン(T)やアデニン(A)が存在するため、キャピラリーの状態の良否を判定に用いるには、上述した345Gに比べて好ましくないものである。しかしながら、345Gのグアニン(G)のような適当なシングルピークがない場合には、使用することもできる。

【0077】なお、例えば、292G, 293Gや294Gは、3塩基長のマルチピークであり、296Gや297Gは、2塩基長のマルチピークであるため、キャピラリーの状態の良否判定には用いないものである。

【0078】さらに、適当なグアニン(G)のシングルピークがない場合には、アデニン(A)のシングルピークの中から適当なピークを選択する必要がある。例えば、309Aのアデニン(A)のシングルピークは、短塩基長側にも、長塩基長側にもシトシン(C)が存在するため、他の塩基の影響を受けにくいという観点からは、キャピラリーの状態の良否を判定に用いることができる。312Aや291Aのアデニン(A)のシングル

$$Rs = (tR2 - tR1) / (W1 + W2) \quad \cdots \cdots (1)$$

分離度Rsが1より大きい状態が、2つのピークが完全に分離した状態である。そこで、本実施形態においては、Rsが0.5以上のときに、キャピラリーの状態が良好であると判断し、これより小さくなると、キャピラリーの状態が不良であると判断している。

【0084】ここで、上式におけるW1, W2, tR1, tR2やΔtを、本実施形態によるキャピラリー電気泳動装置によって得られたクロマトグラムから求めるには時間が掛かり、キャピラリーの状態の判定に用いるにはこのままでは不適當である。そこで、この分離度の考え方を、電気泳動分離された塩基のピークの半値幅に換算するようにしている。即ち、上式において、tR2 - tR1, 即ち、Δtは、核酸の電気泳動分離分析においては、1塩基長に相当する。隣合うピーク1, ピーク2の底辺の幅を等しいものと仮定して、W1=W2=Wとする。すると、上式は、以下になる。

【0085】

$$Rs = \Delta t / W = 1 \text{ 塩基長} / W \quad \cdots \cdots (2)$$

ここで、Wそのものを自動的に検出するよりは、半値幅

*ピークは、長塩基長側にもグアニン(G)が存在するため、キャピラリーの状態の良否を判定に用いるには好ましくないものである。

【0079】以上説明したように、標準試料として、M13mp18を用い、解析塩基長を300塩基長とする場合には、345G若しくは288Gのグアニン(G)のシングルピークを用いることが好ましいものである。

【0080】ここで、標準試料として、M13mp18を用い、解析塩基長を600塩基長とする場合には、上述した要件を満たすグアニン(G)のシングルピークを用いるようにする。また、標準試料として、pUC18やpGEMを用いる場合には、その解析塩基長に応じて、適当なグアニン(G)やアデニン(A)のシングルピークを用いることができる。

【0081】次に、図8を用いて、本実施形態によるキャピラリー電気泳動装置によって検出された特定のシングルピークの半値幅を用いてキャピラリーの状態の良否を判定する基準となる半値幅レベルについて説明する。図8は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるシングルピークの半値幅の説明図である。

【0082】図8は、2つの隣合うピークが完全に分離された状態のクロマトグラムを示している。ここで、ピーク1の底辺の幅をW1とし、ピーク2の底辺の幅をW2とし、ピーク1の極大値が現れる時間をtR1とし、ピーク2の極大値が現れる時間をtR2とし、ピーク1とピーク2の極大値間の時間をΔtとすると、2つのピークの間隔度Rsは、以下の式で与えられる。

【0083】

を検出する方が容易であるため、半値幅W/2は、 $W/2 = 1 \text{ 塩基長} / 2 \cdot Rs = 1 \text{ 塩基長} \quad \cdots \cdots (3)$
(Rs=0.5として)

図8(B)は、電気泳動分離された塩基のピークを示しており、横軸は時間である。電気泳動分離された塩基のシングルピークのピーク値をHとし、その2分の1であるH/2を与えるピークの幅ΔTが、シングルピークの半値幅となる。上述した考え方に基づいて、半値幅ΔTに換算してみると、半値幅ΔTが8.5s以上のときは、キャピラリーの状態が良好であると判定できることになる。

【0086】また、上述した考えを、実際に電気泳動分離された核酸中の塩基の半値幅に換算することも可能である。即ち、図8(C)は、キャピラリー20によって電気泳動分離された塩基の状態を模式的に表している。分析試料が、キャピラリー20の図示左側から導入され、電気泳動分離されると、キャピラリー20の末端部で分離された塩基は、それぞれの半値幅ΔLを有することになる。図8(D)は、電気泳動分離された塩基の蛍

光スペクトルを示しており、横軸は、分離された塩基の長さ L を示している。半値幅 ΔL は、上述した半値幅 ΔT から以下のようにして求めることができる。

【0087】即ち、キャピラリーの全長を l とし、判定に用いるシングルピークがキャピラリーの末端に現れる時間を T とすると、345Gのグアニン(G)の移動速度 v は、以下の式で表せる。

$$【0088】 v = l / T \quad \cdots \cdots (4)$$

また、シングルピークの半値幅 ΔL は、

$$\Delta L = v \cdot \Delta T \quad \cdots \cdots (5)$$

$$= (\Delta T / T) \cdot l \quad \cdots \cdots (6)$$

例えば、345Gのグアニン(G)の場合、時間 T は、5654sであり、キャピラリーの全長 l は30cmであるので、 ΔT が8.5sの場合、 ΔL は、0.45mmとなる。即ち、345Gのグアニン(G)のシングルピークの半値幅 ΔL が0.45mm以上のときは、キャピラリーの状態が良好であると判定できることになる。

【0089】なお、以上の説明においては、その前提条件として、キャピラリーの長さが30cm、その内径が75 μ mであり、キャピラリーに充填する架橋ポリアクリルアミドゲルは、全アクリルアミドおよびビスーアクリルアミドから成り、全アクリルアミドは、全ゲルに対して5重量%、全アクリルアミドに対するビスーアクリルアミドの重量は10%であり、電気泳動分離時にキャピラリーに印加する電気泳動電圧は120V/cmであり、解析塩基長が300塩基長(base)であり、300塩基長付近のシングルピークを判定に用いるというものである。これらの条件が異なると、キャピラリーの状態の良否判定の基準となる半値幅 ΔL 、 ΔT も異なるものとなる。例えば、上述した条件の中で、解析塩基長を600塩基長(base)とすると、半値幅 ΔL は0.35mmとなる。

【0090】しかしながら、一般のキャピラリー電気泳動装置においては、用いるキャピラリーの長さ、内径、用いるゲルの種類、電気泳動電圧、解析塩基長等は予め定まっているものであるため、これらの条件が定めれば、キャピラリーの状態の良否判定の基準となる半値幅 ΔL 、 ΔT も予め求めておくことができる。

【0091】次に、図9を用いて、上述した本実施形態による判定方法を用いて、本実施形態によるキャピラリー判定装置200がキャピラリーの状態の良否を判定する具体的方法について説明する。図9は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリー判定装置の判定処理を示すフローチャートである。

【0092】ステップ910において、制御装置80は、予備泳動を開始する。即ち、測定前にキャピラリー20を平衡化させるため、分析試料をキャピラリー20に注入せずに、高電圧電源30からキャピラリー20の両端に電圧印加のみ行う。予備泳動の条件は、120V

/cmで、20分間とする。

【0093】ステップ920において、制御装置80は、キャピラリーに分析試料及び標準試料を導入する。分析試料及び標準試料は、サンプルトレイ100に収容されており、キャピラリー20をバッファ槽12からサンプルトレイ100に接続替えし、高電圧電源30を制御装置80により制御して、電圧印加させて試料をキャピラリー20に導入する。導入条件は、50V/cmで10秒間とする。

【0094】ステップ930において、制御装置80は、再び、キャピラリー20をサンプルトレイ100からバッファ槽12に接続替えし、高電圧電源30を制御し、電圧印加させて試料中の各DNA断片成分をキャピラリー20中に電気泳動させる。電気泳動電圧を120V/cmとする。検知器ユニット60は、各DNA断片成分の分離を検出する。信号処理ユニット70は、試料DNAの塩基配列の決定をする。

【0095】ステップ940において、キャピラリー判定装置200は、特定ピークの半値幅計算をする。特定ピークは、上述したように、345Gのグアニン(G)のシングルピークを選定して半値幅 ΔL を計算する。

【0096】次に、ステップ950において、キャピラリー判定装置200は、求められた半値幅 ΔL に基づいて、キャピラリーの状態の良否を判定する。ここでは、例えば、半値幅 ΔL が0.45mm以下であれば良好と判断する。判定が良好であれば、ステップ920に戻り、同じキャピラリー20を用いた次の測定に移行する。また、半値幅が0.45mmを越えれば不良とし、ステップ960に進む。

【0097】ステップ960において、キャピラリー判定装置200は、表示部210に、異常メッセージを表示する。

【0098】ここで、図10を用いて、本実施形態における表示部210に表示される異常メッセージの一例について説明する。図10は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置における異常メッセージの表示例の説明図である。

【0099】図10に示すように、表示部210の測定結果表示部210Aには、測定結果である半値幅(図示の例では、0.55mm)が表示され、基準値表示部210Bには、基準値である半値幅(図示の例では、0.45mm)が表示されるとともに、クロマトグラム表示部210Cに検出されたピークのクロマトグラムが表示される。

【0100】さらに、判定表示部210Dには、判定結果に対するメッセージが表示され、図示の例では、「半値幅が広すぎます。チェックしてください」と表示されている。判定表示部210Dの下には、判断入力ダイアログ210Eが表示される。

【0101】ステップ970において、オペレータは、

図10に示した判定結果に基づいて、キャピラリーの使用を続行するか終了するかを判断する。続行若しくは終了の選択は、入力部220を用いて、判断入力ダイアログ210Eの「続行する」若しくは「終了する」のボタンをマウス等でクリックすることで行われる。続行する場合には、ステップ920に戻って、次の試料の分析が行われ、終了する場合には、その時点で終了し、キャピラリーの交換を行う。

【0102】次に、図11を用いて、本実施形態によって行われたキャピラリーの判定結果の一例について説明する。図11は、本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリーの判定結果の一例の説明図である。

【0103】図11に示すように、第1回目の電気泳動分析において、半値幅は0.26mmとなっており、判定結果は「良」となっている。以後、第5回目までは、半値幅は、0.45mm以下であり、判定結果は「良」となっている。しかしながら、第6回目には、検出された半値幅は0.47mmとなったため、判定結果は、「否」となっている。この結果に基づいて、第6回目までの分析は自動的に繰り返し行われるとともに、オペレータの判断により、以降の繰り返し測定を中止する。

【0104】なお、以上の説明では、標準試料の特定ピーク、例えば、M13mp18の345Gのシングルピークを用いて、キャピラリーの状態の良否を判定するようにしている。しかしながら、標準試料を用いる方法では、図1に示したように、サンプルトレイ100に48個の試料を収容できる場合、その内の1個には標準試料を収容する必要があるため、同時に分析できる試料数が47個となる。

【0105】それに対して、以下に説明するように、標準試料を用いることなく、即ち、分析試料中のシングルピークを用いても、キャピラリーの状態の良否判定を行うことができる。キャピラリー判定装置200は、検知器ユニット60から得られた信号に基づいて、図6や図7に示したようなクロマトグラムを求める。そして、キャピラリー判定装置200は、解析塩基長付近のシングルピークであり、そのピークは、検出される複数の塩基のピークの中で、その蛍光スペクトルが短波長側に極大ピークを有するもの、若しくは最も短波長側の特定ピークがない場合には、蛍光スペクトルが次に短波長側に極大ピークを有するものとし、このピークの両側の塩基長に、蛍光スペクトルの極大ピークが短波長側及び長波長側の隣接する塩基のピークが無いピークを、キャピラリーの状態の良否判定に用いる特定ピークとする。特定ピークの塩基長が300塩基長付近であれば、基準となる半値幅 ΔL を0.45mmとし、600塩基長付近であれば、半値幅 ΔL を0.35mmとするように、塩基長毎に半値幅 ΔL の基準値を定めておくことにより、標準試料の特定ピークを用いる場合と同様にして、キャピラ

リー状態の良否判定を行うことができ、サンプルトレイに収容できる試料数が48の場合には、分析試料数を48個とでき、同時に分析可能な試料数を増加することができる。

【0106】試料数が48個の場合、48本のキャピラリーのすべてについて、上述したキャピラリーの状態の良否判定を行う。キャピラリーの交換は、1本ずつ行うのは手間がかかるため、同時に48本行うようにしたほうが好ましく、そのため、48本のキャピラリーの判定の結果として、全体の80%（即ち、48本のキャピラリーの内、39本）のキャピラリーが良好であると判定された場合には、キャピラリーの交換は行わず、それ以上に不良キャピラリーの本数が増えた場合に、全体のキャピラリーの交換を行うようにする。

【0107】また、キャピラリーの状態は、全体的にほぼ同様に変わると考えられるため、全てのキャピラリーについて同時に判定することなく、例えば、図1に示すように、48本の並列配置されたキャピラリー20の場合、両端の2本と中央の1本の合計3本のキャピラリーのように、代表的なキャピラリーの状態の良否判定を行うようにしてもよいものである。このようにすることにより、キャピラリー判定装置200の判定処理の負担を軽減することが可能となる。

【0108】以上説明したように、本実施形態によれば、所定のシングルピークの半値幅を用いて、キャピラリーの状態の良否を判定することができる。従って、キャピラリーに充填されたゲルを交換することなく複数回の分析に繰り返し使用する場合でも、データの信頼性を確保することができる。

【0109】次に、図12～図14を用いて、本発明の他の実施形態によるキャピラリー電気泳動装置について説明する。本実施形態によるキャピラリー電気泳動装置の全体的なシステム構成は、図1に示したものと同様である。第1の実施形態においては、キャピラリー判定装置200は、検知器ユニット60によって検出された信号に基づいて、キャピラリーの状態の良否を判定するようしていたのに対して、本実施形態においては、図1に示すように、電流検出手段90によって、泳動電流を検出し、キャピラリー判定装置200は、検出された泳動電流に基づいて、キャピラリーの状態の良否を判定するようになっている。

【0110】上述したように、キャピラリーの状態が不良になると、ピークの半値幅が広がることになる。キャピラリーが不良となる原因は、種々考えられるが、例えば、キャピラリーに充填されたゲル中にボイドが発生することや、ゲルに分析試料が付着することや、ゲルのネットワークが切れること等がある。この中で、最も大きな要素が、ゲル中のボイドの発生である。キャピラリーに充填されたゲル中にボイドが発生すると、ボイドの位置で分離されていた塩基はボイドを避けるようにし

で泳動を続けることとなり、ボイドを避ける際に、分離状態が悪化する。この結果は、半値幅の広がりとなって検出される。

【0111】一方、キャピラリーの中のゲルにボイドが発生すると、その部分の電気伝導度が異なるため、電気が流れ難くなるものと考えられる。そこで、本願発明者らは、半値幅の増減と、泳動電流の相関について研究を進めたところ、両者には相関が見られることが判明した。泳動電流は、キャピラリーの初期状態では低く、分析を繰り返すに従って、増加することが判明した。そして、上述したようなキャピラリーの内径や長さ、充填するゲルの種類等を同じ条件にして、標準試料のM13mp18の345Gのピークの半値幅 ΔL が0.45mmとなると、泳動電流について求めたところ、2.8 μ Aであった。即ち、泳動電流が2.8 μ Aより大きいときは、キャピラリーの状態は良好であると判断でき、2.8 μ Aよりも小さくなると、キャピラリーの状態は不良であると判断できる。

【0112】また、電気泳動には、実際に分析試料の電気泳動を行う本泳動以外に、キャピラリーの平衡をとるための予備泳動があるが、予備泳動時の泳動電流を用いても、同様の判定を行うことができる。上述したようなキャピラリーの内径や長さ、充填するゲルの種類等を同じ条件にして、標準試料のM13mp18の345Gのピークの半値幅 ΔL が0.45mmとなると、予備泳動の泳動電流について求めたところ、3.5 μ Aであった。即ち、予備泳動の泳動電流が3.5 μ Aより小さいときは、キャピラリーの状態は良好であると判断でき、3.5 μ Aよりも高くなると、キャピラリーの状態は不良であると判断できる。

【0113】ここで、図12を用いて、本実施形態による泳動電流による判定方法を用いて、キャピラリー判定装置200がキャピラリーの状態の良否を判定する具体的方法について説明する。図12は、本発明の他の実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリー判定装置の判定処理を示すフローチャートである。なお、図9と同一符号は、同一処理を示しており、本実施形態においては、図9に示した処理にくわえて、ステップ1210～1250の泳動電流値による判定処理が追加されているので、特に、これらの処理について説明する。

【0114】ステップ910において、制御装置80は、予備泳動を開始する。即ち、測定前にキャピラリー20を平衡化させるため、分析試料をキャピラリー20に注入せずに、高電圧電源30からキャピラリー20の両端に電圧印加のみ行う。予備泳動の条件は、120V/cmで、20分間とする。

【0115】ステップ1210において、キャピラリー判定装置200は、電流検出手段90によって検出された電流値を測定する。

【0116】次に、ステップ1220において、キャピラリー判定装置200は、測定された予備泳動の電流幅に基づいて、キャピラリーの状態の良否を判定する。ここでは、例えば、電流値が3.5 μ A以下であれば良好と判断する。判定が良好であれば、ステップ920に進み、本泳動の測定に移行する。また、電流値が3.5 μ Aを越えれば不良とし、ステップ1230に進む。

【0117】ステップ1230において、キャピラリー判定装置200は、表示部210に、異常メッセージを表示する。

【0118】ここで、図13を用いて、本実施形態における表示部210に表示される異常メッセージの一例について説明する。図13は、本発明の他の実施形態によるキャピラリー電気泳動装置における異常メッセージの表示例の説明図である。

【0119】図13に示すように、表示部210の測定結果表示部210Aには、測定結果である電流値（図示の例では、4.5 μ A）が表示され、基準値表示部210Bには、基準値である電流値の範囲（図示の例では、2.8 μ A～3.5 μ A）が表示される。

【0120】さらに、判定表示部210Dには、判定結果に対するメッセージが表示され、図示の例では、「電流値が高すぎます。チェックしてください」と表示されている。判定表示部210Dの下には、判断入力ダイアログ210Eが表示される。

【0121】ステップ1240において、オペレータは、図13に示した判定結果に基づいて、キャピラリーの使用を続行するか終了するかを判断する。続行若しくは終了の選択は、入力部220を用いて、判断入力ダイアログ210Eの「続行する」若しくは「終了する」のボタンをマウス等でクリックすることで行われる。続行する場合には、ステップ920に進んで、本泳動が行われ、終了する場合には、その時点で終了し、キャピラリーの交換を行う。

【0122】ステップ920において、制御装置80は、キャピラリーに分析試料及び標準試料を導入する。分析試料及び標準試料は、サンプルトレイ100に収容されており、キャピラリー20をバッファ槽12からサンプルトレイ100に接続替えし、高電圧電源30を制御装置80により制御して、電圧印加させて試料をキャピラリー20に導入する。導入条件は、50V/cmで10秒間とする。

【0123】ステップ930において、制御装置80は、再び、キャピラリー20をサンプルトレイ100からバッファ槽12に接続替えし、高電圧電源30を制御し、電圧印加させて試料中の各DNA断片成分をキャピラリー20中に電気泳動させる。電気泳動電圧を120V/cmとする。検知器ユニット60は、各DNA断片成分の分離を検出する。信号処理ユニット70は、試料DNAの塩基配列の決定をする。

【0124】さらに、ステップ1250において、本泳動時の電流値を判定する。判定値が所定値より大きい場合には、ステップ1230、1240と進み、上述した以上メッセージの表示及び処理続行の判定を行う。

【0125】また、ステップ940以降において、キャピラリー判定装置200は、特定ピークの半値幅によるキャピラリーの状態の良否を判定を行う。

【0126】次に、図14を用いて、本実施形態によって行われたキャピラリーの判定結果の一例について説明する。図14は、本発明の他の実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリーの判定結果の一例の説明図である。

【0127】図14に示すように、予備泳動の電気泳動分析において、予備泳動の電流値は3.2 μ Aとなっており、基準レベルである3.5 μ A以下であるため、判定結果は「良」となっている。次に、本泳動の第1回目においては、本泳動の電流値は3.0 μ Aとなっており、以後、第5回目までは、電流値は、2.8 μ A以上であり、判定結果は「良」となっている。しかしながら、第6回目には、検出された電流値は2.7 μ Aとなつたため、判定結果は、「否」となっている。この結果に基づいて、第6回目までの分析は自動的に繰り返し行われるとともに、オペレータの判断により、以降の繰り返し測定を中止する。

【0128】なお、以上の説明では、電流検出手段90が検出する電流値は、48本のキャピラリー20を流れる電流の総和であるため、キャピラリー判定装置200は、1本当たりの電流値に換算して、キャピラリーの状態を判定するようにしている。電流検出手段90が個々のキャピラリーの電流値を検出可能な場合には、個々のキャピラリーの電流値に基づいて、キャピラリーの状態の良否判定を行うようにする。

【0129】以上説明したように、本実施形態によれば、泳動電流を用いて、容易にキャピラリーの状態の良否を判定することができる。従って、キャピラリーに充填されたゲルを交換することなく複数回の分析に繰り返し使用する場合でも、データの信頼性を確保することができる。

【0130】

【発明の効果】本発明によれば、キャピラリー電気泳動装置において、ゲルを交換することなく複数回の分析に繰り返し使用する場合でも、データの信頼性を確保することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置の全体構成を示すブロック図である。

【図2】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動分析装置に用いる検知器ユニットの構成を示す光学系のブロック図である。

【図3】本発明の一実施形態による多色蛍光検出電気泳

動分析装置における発光点と1次元光センサの受光面に形成された像の関係の説明図である。

【図4】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置によって得られるクロマトグラムの模式図である。

【図5】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置を用いて、各末端塩基から得られる蛍光スペクトルである。

【図6】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置において測定される標準試料の電気泳動分離分析によって得られたクロマトグラムである。

【図7】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置において測定される標準試料の電気泳動分離分析によって得られたクロマトグラムである。

【図8】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるシングルピークの半値幅の説明図である。

【図9】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリー判定装置の判定処理を示すフローチャートである。

【図10】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置における異常メッセージの表示例の説明図である。

【図11】本発明の一実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリーの判定結果の一例の説明図である。

【図12】本発明の他の実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリー判定装置の判定処理を示すフローチャートである。なお、図9と同一

【図13】本発明の他の実施形態によるキャピラリー電気泳動装置における異常メッセージの表示例の説明図である。

【図14】本発明の他の実施形態によるキャピラリー電気泳動装置におけるキャピラリーの判定結果の一例の説明図である。

【符号の説明】

10…移動機構

12…泳動バッファ槽

13…白金電極

14…サンプルトレイホルダ

16…モータ

18…スライドガイド

19…カバー

20…キャピラリー

22, 24…キャピラリー押さえ

26…カプラ

30…高電圧電源

40…シースフローセル

44…シース液

50…レーザ

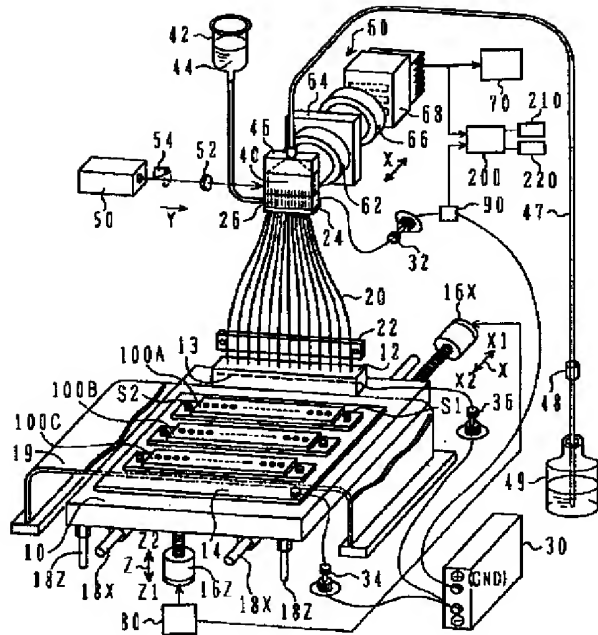
25

26

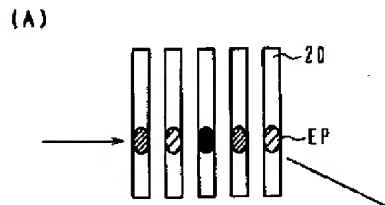
60…検知器ユニット
64…フィルタ
68…光センサ
70…信号処理装置

80…制御装置
90…電流検出手段
100…サンプルトレイ
200…キャピラリー判定装置

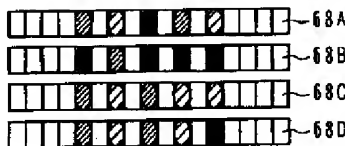
【図1】



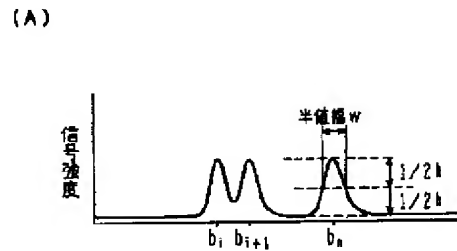
【図3】



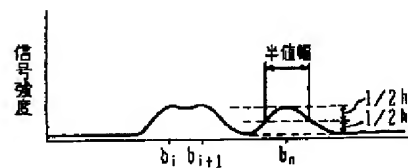
(B)



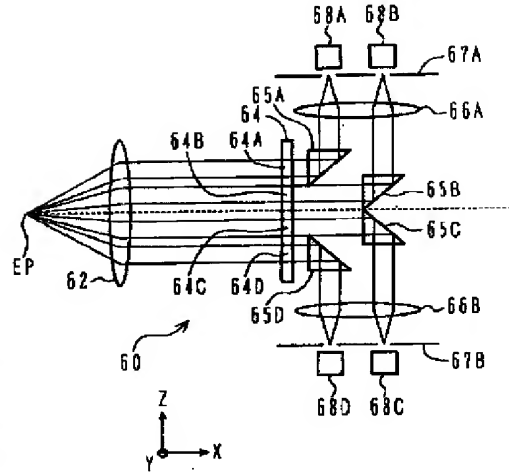
【図4】



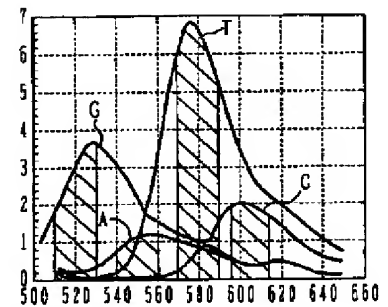
(B)



【図2】



【図5】



[illegible]

```
graph TD
    910[予備泳動開始] --> 920[試料導入]
    920 --> 930[分析（電泳泳動）開始]
    930 --> 940[半価幅計算]
    940 --> 950{半価幅判定}
    950 -- 合格 --> 960[異常メッセージ表示]
    950 -- 不合格 --> 970{オペレータ判断で続行}
    960 --> 970
    970 -- 続行 --> 950
    970 -- 終了 --> 終了[終了]
```

The flowchart illustrates the measurement method for the half-wave rectification ratio. It begins with a rectangular box labeled '予備泳動開始' (Pre-electrophoresis start) with reference numeral 910. An arrow points down to another rectangular box labeled '試料導入' (Sample introduction) with reference numeral 920. From there, an arrow points down to a rectangular box labeled '分析（電泳泳動）開始' (Analysis (electrophoresis) start) with reference numeral 930. Another arrow points down to a rectangular box labeled '半価幅計算' (Half-width calculation) with reference numeral 940. Below this is a diamond-shaped decision box labeled '半価幅判定' (Half-width determination) with reference numeral 950. An arrow labeled '合格' (Pass) points from the bottom of the diamond to a rectangular box labeled '異常メッセージ表示' (Abnormal message display) with reference numeral 960. An arrow labeled '不合格' (Fail) points from the right side of the diamond to a second diamond-shaped decision box labeled 'オペレータ判断で続行' (Continue by operator judgment) with reference numeral 970. From the '異常メッセージ表示' box, an arrow points down to the 'オペレータ判断で続行' diamond. From the 'オペレータ判断で続行' diamond, an arrow labeled '続行' (Continue) points back to the '半価幅判定' diamond, and an arrow labeled '終了' (End) points down to a final rectangular box labeled '終了' (End).

210

210A

測定結果 : 0.55mm

210B

基準値 : 0.45mm

210C

判定 : 電流値が広過ぎます。チェックしてください。

210D

このまま続行しますか？

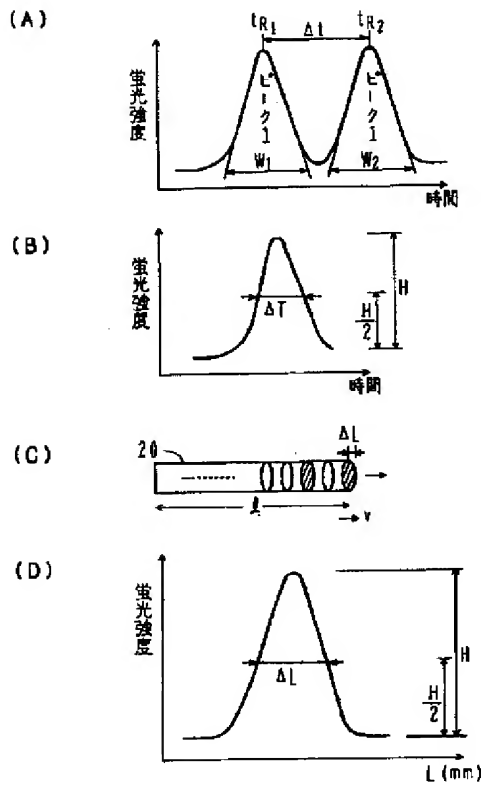
210E

続行する

終了する

繰り返し回数	半偏幅	判定結果 (良否)
1回目	0.26mm	良
2回目	0.28mm	良
3回目	0.29mm	良
4回目	0.36mm	良
5回目	0.41mm	良
6回目	0.47mm	否

【図 8】



【図 13】

210

測定結果 : 4.5 μ A 210A

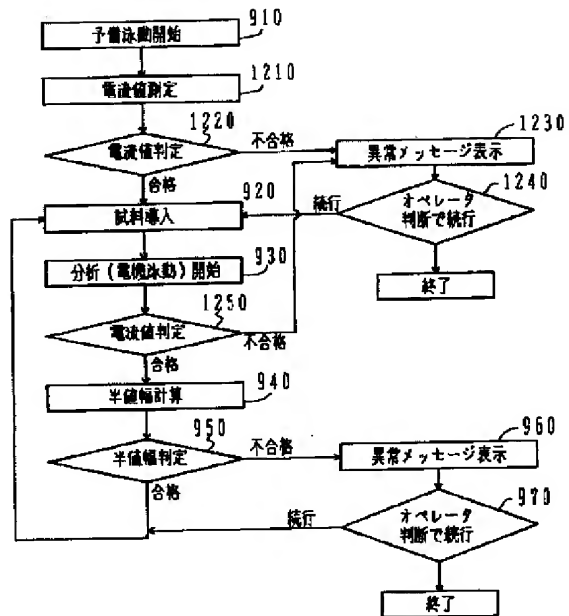
基準値範囲 : 2.8 μ A ~ 3.5 μ A 210B

判定 : 電流値が高過ぎます。チェックしてください。 210D

このまま続行しますか? 210E

続行する 終了する

【図 12】



【図 14】

繰り返し回数	電流値	判定結果 (良否)
予備泳動	3.2 μ A	良
1 回目	3.0 μ A	良
2 回目	3.0 μ A	良
3 回目	3.0 μ A	良
4 回目	3.0 μ A	良
5 回目	3.0 μ A	良
6 回目	2.7 μ A	否

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成13年10月10日(2001.10.10)

【公開番号】特開平11-108889

【公開日】平成11年4月23日(1999.4.23)

【年通号数】公開特許公報11-1089

【出願番号】特願平9-265333

【国際特許分類第7版】

G01N 27/447

21/64

【FI】

G01N 27/26 315 K

21/64 Z

【手続補正書】

【提出日】平成13年1月9日(2001.1.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図13

【補正方法】変更

【補正内容】

【図13】

210

測定結果 : 4.5 μ A 210A

基準値範囲 : 2.8 μ A ~ 3.5 μ A 210B

判定 : 半値幅が両過ぎます。チェックしてください。 210D

このまま続行しますか? 210E

続行する 終了する